

AJ

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011470537

WPI Acc No: 1997-448444/199741

XRAM Acc No: C97-142953

Composition for introduction of genes into the liver of a neonatal lactational animal - useful in potential gene therapy for, e.g. phenyl ketonuria, congenital ammonaemia, familial hypercholesterolaemia, haemophilia B, etc.

Patent Assignee: Dनावेक रेस इन्क (Dनावेक-एन)

Inventor: HASEGAWA M; KANEDA Y; OGIWARA T

Number of Countries: 019 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9731656	A1	19970904	WO 97JP612	A	19970228	199741 B
JP 9530809	X	19990427	JP 97530809	A	19970228	199927
			WO 97JP612	A	19970228	

Priority Applications (No Type Date): JP 9645250 A 19960301

Cited Patents: 2.Jnl.Ref

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

WO 9731656	A1	J	20	A61K-048/00	
------------	----	---	----	-------------	--

Designated States (National): JP US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

JP 9530809	X	A61K-048/00	Based on patent WO 9731656
------------	---	-------------	----------------------------

Abstract (Basic): WO 9731656 A

A new composition applicable to the liver of a neonatal lactational animal, to stably introduce a gene into liver cells, contains a compound with an affinity for both nucleic acids and liver cells, and a vector for gene introduction.

USE - The composition is used to stably introduce genes into liver cells (claimed). The composition provides a potential gene therapy method for, e.g. phenyl ketonuria, congenital ammonaemia, familial hypercholesterolaemia and haemophilia B.

Dwg.0/3

Title Terms: COMPOSITION; INTRODUCING; GENE; LIVER; NEONATAL; ANIMAL; USEFUL; POTENTIAL; GENE; THERAPEUTIC; PHENYL; CONGENITAL; AMMONAEMIA; FAMILIAL; HYPERCHOLESTEROLAEMIC; HAEMOPHILIA

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-048/00

International Patent Class (Additional): C12N-015/67; C12N-015/86; C12N-015/88

File Segment: CPI



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 48/00, C12N 15/88, 15/67, 15/86	A1	(11) 国際公開番号 WO97/31656 (43) 国際公開日 1997年9月4日 (04.09.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00612 (22) 国際出願日 1997年2月28日 (28.02.97)	(74) 代理人 弁理士 清水初志 (SHIMIZU, Hatsushi) 〒300 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平8/45250 1996年3月1日 (01.03.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP) (71) 出願人; および (72) 発明者 金田安史 (KANEDA, Yasufumi) [JP/JP] 〒562 大阪府箕面市小野原東6丁目12番8号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 萩原俊男 (OGIWARA, Toshio) [JP/JP] 〒562 大阪府箕面市桜ヶ丘2丁目7番29号 Osaka, (JP) 長谷川護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: COMPOSITION FOR STABLY INTRODUCING GENES INTO LIVER CELLS AND METHOD OF INTRODUCING GENES BY USING SAID COMPOSITION (54) 発明の名称 肝細胞への安定的な遺伝子導入のための組成物及び該組成物を用いた遺伝子導入方法 (57) Abstract It has been found out that genes can be stably introduced into liver cells by applying a composition containing a compound having affinity for both nucleic acids and liver cells and a vector for gene introduction to the liver of a neonatal lactational animal. As the liver functions as the site of synthesis of various proteins and the proteins secreted stably by stably introducing genes into liver cells circulate through the whole body via bloodstream, this method is expected to have an efficient therapeutic effect on diseases. As the liver functions also as the site of onset of various metabolic diseases, the stable introduction of genes into liver cells and the expression thereof are expected to establish the methods of gene therapy for various diseases.		

(57) 要約

授乳期新生動物の肝臓に、核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物と遺伝子導入用ベクターとを含む組成物を適用することによって、遺伝子が肝細胞に安定的に導入されることを見いだした。肝臓は多くの蛋白質の合成の場であり、遺伝子が肝細胞に安定的に導入されることにより安定的に分泌される蛋白質は血流を介して全身に循環するため、疾病に対する効率的な治療効果が期待される。また、肝臓は多くの代謝性疾患の発症の場でもあり、遺伝子が肝細胞に安定的に導入されかつ発現されることにより、様々な疾病に対する遺伝子治療法が確立することが期待される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア共和国
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BH	ブルハナ・ファソ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジクスタン
CC	カナダ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KZ	カザフスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボワール	KR	韓国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KH	カンボジア	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CO	コロンビア	LA	ラオス	PT	ポルトガル	VN	ベトナム
DE	ドイツ	LV	リトニア	RO	ルーマニア	YU	ユーゴスラビア
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン				

明細書

肝細胞への安定的な遺伝子導入のための組成物

及び該組成物を用いた遺伝子導入方法

技術分野

本発明は、細胞への遺伝子導入技術または遺伝子治療技術に関する。本発明は特に、肝臓への遺伝子導入または遺伝子治療に用いるベクターを含む遺伝子導入用組成物、及び該組成物を用いた遺伝子導入方法に関する。

背景技術

遺伝子治療は、既知の有効な治療法が存在しないヒトの疾患に対する可能性のある、新規な方法として出現した。1990年に初めてヒトで実験が行われて以来（Miller AD., Nature, 1992; 357: 455-460、Anderson WF., Science, 1992; 256: 808-813、Zabner J et al., Cell, 1993; 75: 207-216）、遺伝子治療の適用は、癌、免疫不全、および心血管疾患のような多くの疾患を含む範囲へと拡大してきた。遺伝子治療の臨床への適用には、効果的で安全な遺伝子輸送系が必要である。過去十年にわたり、多くのインビトロおよびインビボ遺伝子導入法が報告されている。リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、陽イオン性リボソーム法、およびエレクトロポレーション法が、インビトロで外来遺伝子を様々な細胞に導入するために用いられている。インビボ遺伝子導入法には、ウィルス（レトロウィルス、アデノウィルスなど）による導入法、リボソームによる導入法、および直接注入が含まれる。これらの方法には、それぞれ利点、欠点がある。例えば、レトロウィルス法は、高い効率で遺伝子をゲノムに取り込ませることが可能であるが、1) 挿入サイズの限界、2) 最終分化した細胞における効率の低さ、3) 野生型ウィルス感染及び癌遺伝子の活性化の可能性がある等の欠点を有する。またアデノウ

ィルス法は、複製しない分化細胞において効率がよいため広く用いられているが、1) ウィルス感染およびウィルス抗原誘導免疫の可能性があり、2) 挿入サイズが制限され、3) 取り込みが起こらず、遺伝子発現が一時的である等の欠点を有する (Cullinton BL. Science 1990;249:1372、Felgner PL, Rhodes G. Nature 1991;349:351-352、Miller AD. Nature 1992;357:455-460、Anderson WF. Science 1992;256:808-8131、Morishita R et al. Cardiovascular Pharmacology And Therapeutics eds, Singh BN, p1661, New York, Libingstone Publisher, 1993、Dzau VJ, Morishita R, Gibbons GH. Trends in Biotechnology 11:205-210, 1993、Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R, Prett E. Hypertension 1994;23:1132-1140)。

それらの欠点を克服するため、インビボ遺伝子導入のためのHVJ (センダイウィルス) 法が開発された。HVJ法は、外来DNAを、リボソーム、核タンパク質、および細胞膜への融合を仲介するウィルス外被タンパク質と複合体を形成させることを特徴とする。この方法は、1) 効率がよく、2) 安全であり、3) 操作が簡便であり、4) インキュベーション時間が短く、5) 挿入DNAのサイズが制限されない、という利点を有し、肝臓、腎臓、および血管壁を含む多くの組織へのインビボ遺伝子導入に用いられ成功を収めている (Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. J Biol Chem 1989;264:12126-12129、Kato K et al. J Biol Chem 1991;266:3361-3364、Tomita N et al. Biochem Biophys Res Commun 1992;186:129-134、Tomita N et al. Circ Res 1993;73:898-905、Tomita N et al. Cancer Dete Prev 1994;18:485-491、Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Science 1989;243:375-378、Morishita R et al. J. Clin. Invest 1994;94:978-984)。HVJ-リボソーム法においては更に、ハイモビリティグループ1 (HMG-1) という核タンパク質を用いることが可能である。HMG-1は細胞質への侵入直後に融合タンパク質を核へ移行させることができ、また導入された外来遺伝子の細胞における安定性を維持することにも貢献する (Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Science 1989;243:375-378)。しかし、この方法にも、外来遺伝子の発現が一時的であるという欠点がある。例えば、ヒトインスリン遺

伝子、およびヒトレニン遺伝子の成人肝臓へのトランスフェクションでは、各々2週間、および1週間しか発現が持続しなかった。

なお、肝臓で合成される多くのタンパク質は循環系へ分泌され、また肝臓は多くの代謝性疾患の発症の場であるため、肝臓は疾病に対する遺伝子治療のために望ましい標的部位であり、肝臓へ安定的に遺伝子導入を行うことは、重要な課題である。

発明の開示

本発明は、生体の肝臓に遺伝子を安定的に導入する方法、及び該方法に適用される組成物を提供することを課題とする。

本発明者らは、新生ラットの肝臓に対し遺伝子導入を行うことにより、安定的に遺伝子を導入することが可能なのではないかと考えた。その理由は、新生肝臓は、活発に複製する臓器であり、そのため複製中の宿主ゲノムへ外来遺伝子を導入できることが期待されるためである。

そして、本発明者らは、核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物と遺伝子導入用ベクターとを含む組成物を、生存しているヒト以外の授乳期新生動物の肝臓に注入することによって、効率よく肝細胞に安定的な遺伝子導入を行うことができることを実験によって確認し、本発明を完成した。より具体的には、本発明者らは、授乳期新生動物の肝臓に、核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物と遺伝子導入用ベクターとを含む組成物を用いて遺伝子を導入したところ、持続的な遺伝子発現が達成されることを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下のものを含む。

- (1) 生体の肝細胞に遺伝子を安定的に導入するための、核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物と遺伝子導入用ベクターとを含む、授乳期新生動物の肝臓に適用される組成物、
- (2) 核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物がリボソームを形成して

いる、(1)記載の組成物、

(3) 不活性化されたセンダイウイルスを含む、(1)記載の組成物、(4)
核移行性蛋白質を含む(1)記載の組成物、

(5) (1)～(4)のいずれかに記載の組成物またはその溶解物を、ヒト以外の生体の授乳期新生動物の肝臓に適用し、該生体の肝細胞に遺伝子を安定的に導入する方法。

本発明の組成物は、そのままの形でまたは薬学的に許容される液体に懸濁して用いることができる。本発明の組成物またはその溶解物を生体の授乳期新生動物の肝臓に適用する方法としては、注射器等により腹腔壁を通して肝臓中に直接注入する方法または門脈へ注入する方法等がある。

本発明の「核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物」としては、リン脂質からなる人工的に作製した膜構造物であるリボソーム及び複合体、HVJ-リボソームを含むリボソーム(「ライフサイエンスにおけるリボソーム/実験マニュアル」シュブリンガー・フェアラーク東京(1992)p.282～288等を参照)が用いられる。

また、本発明の「遺伝子導入用ベクター」としては、基本的にはすべての遺伝子導入用ベクターが用いられるが、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルスベクターなどの遺伝子導入用ベクターが用いられる。

なお本発明の組成物は全ての哺乳動物に適用可能であり、例えば、ヒト、マウス、ウサギ、ウシ、またはサルなどに適用可能である。

本発明において、核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物はリボソームを形成してもよい。リボソームは公知の方法により作成できる。また、本発明の組成物には、不活化されたセンダイウイルス(HVJ)が含まれていてもよい。

本発明において核移行性蛋白質とは、DNAと結合し、かつDNAの核移行性を容易にする蛋白質をいう。より具体的にはハイモピリティグループ-1(HMG-1)、SV40ラ

ージT抗原、ポリオーマウィルスラージT抗原、ヌクレオプラスミン等がある。本発明の組成物には、これらの核移行性蛋白質が含まれていてもよい。

本発明による遺伝子治療は、肝細胞を標的細胞とする多くの代謝異常症、特にアミノ酸代謝異常症や有機酸代謝異常症などの疾患に適用可能であり（「臨床遺伝医学[VI]遺伝子治療と予防」診断と治療社(1995)等を参照）、具体的な適用例として以下のものが挙げられる。

(1) フェニルケトン尿症

アミノ酸代謝異常症の一つであり、現在遺伝子治療の研究が進んでいる疾患である。フェニルアラニン水酸化酵素の欠損に基づく疾患であり、早期からの厳格な低フェニルアラニン食餌療法が施されている。フェニルアラニン水酸化酵素遺伝子を本法により肝臓に導入する治療方法が考えられる。

(2) 先天性高アンモニア血症

先天性高アンモニア血症のなかでもっとも頻度が高い疾病が、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症である。オルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子は、X染色体上に位置し、これまで多くの突然変異が報告されている。現在行われている治療法は、血漿交換、腹膜透析などによる物理的なアンモニアの除去、薬物治療(安息香酸ソーダ、L-カルニチン、シトルリンなど)、栄養治療(蛋白制限とアルギニン補充)であるが、現行の治療法は十分な効果をあげていない。しかしながら、一部の疾患では肝臓移植が行われ効果を上げている。そこでオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子を本法により肝臓に導入する治療方法が考えられる。また尿素サイクル異常症のひとつであるシトルリン血症はオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症と同様に肝臓での酵素活性低下が病態の中心であるので肝臓での遺伝子発現が達成されれば、治療効果は上がるものと考えられる。その他、カルバミルリン酸合成酵素欠損症は重症患者では現行の治療は十分な効果をあげていない。この疾患もオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症と同様の戦略で遺伝子治療が可能な疾患であると考えられる。アルギニノコハク酸尿症に関して

も現行の治療は十分な効果を上げていない。この疾患は肝移植を行って治療効果が確認されており、肝臓を標的とした遺伝子治療が、有効であると考えられる。アルギニン血症は基本的には肝臓での酵素欠損が疾患発症に重要な役割を果たしているため、肝臓への遺伝子導入が達成できれば、治療効果は上がるものと考えられる。

(4) 家族性高コレステロール血症

この疾患は有病率が高く、従来ヘテロ接合体患者に対しては食餌療法、薬物療法が施されているが、ホモ接合体患者に対してはこの療法は無効であり、プラズマフェレーシス、肝移植が施されている。しかしながら、いずれの治療法も十分な効果を上げていない。この疾患の治療は肝臓においてLDLレセプター機能を回復させることが必要にしてかつ十分であることが、ホモ接合体患者に行われた肝移植により高コレステロール血症が是正された事実から確認された。すなわち、肝臓にLDLレセプター遺伝子を導入して発現させることが家族性高コレステロール血症に対する遺伝子治療の中心課題であり、本法が有効に利用できると思われる。

(5) 血友病B

血友病Bは、肝臓で作られる第IX凝固因子の先天的な欠損によって起こる伴性劣性遺伝病である。現在、献血または遺伝子工学的技法によって作製された第IX凝固因子製剤の輸注が唯一の治療法である。本法により第IX凝固因子遺伝子を肝臓に導入し、発現させることにより有効な治療法が確立するものと考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、構築したインスリンベクターを示す図である。

図2は、ヒトインスリンベクター及び対照ベクターを肝臓に注入後、発現するヒトインスリンmRNAのRT-PCR分析を示す図である。

図3は、ヒトインスリンベクター及び対照ベクターを肝臓に注入した後の、血

中インスリンの経時変化をラジオイムノアッセイにより測定した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】 センダイウィルスーリボソームの調製

ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、及びコレステロールを重量比 1:4.8:2 で混合した。乾燥させた脂質をプラスミド DNA またはフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識オリゴヌクレオチド (ODN) を含んだ 200 μ l の BSS 溶液 (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM トリス-塩酸 / pH 7.6) 中に懸濁した。リボソームは振とう及び超音波処理により調製した。

一方、HVJ (2 株) を精製し、使用直前に 3 分間紫外線照射 (110 erg/mm^2 秒) を行い、不活性化した。前述のリボソーム溶液 (10 mg リボソーム / 0.5 ml 溶液) を 10,000 赤血球凝集単位の HVJ と混合し、BSS 溶液で希釈し最終容量を 4 ml とした。混合液を 4°C で 5 分間保持し、その後 37°C で 30 分間穏やかに振とうした。なお、未反応の HVJ とリボソームは蔗糖密度勾配遠心分離法で HVJ-リボソームから取り除いた。

【実施例 2】 フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識オリゴヌクレオチド (ODN) のインビボ導入

オリゴヌクレオチド (ODN) は DNA 合成機 (Applied Biosystems 社) で調製し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて精製した後、70% エタノールで洗浄、乾燥し、TE 緩衝液 (10 mM トリス-塩酸; pH 7.5, 1 mM エチレンジアミン四酢酸; pH 8.0) に懸濁した。ODN の 5' 末端を FITC 標識し、ODN の濃度を分光光度計により決定した。この標識 ODN と実施例 1 の方法で調製した HVJ-リボソーム 100 μ l とを混合し、生後 2 日のウィスターラットの肝臓へ、27 ゲージの注射針を用い腹腔壁を通して注入した。肝臓に注入する FITC 標識 ODN は最終濃度 (全リボソーム溶液に対する OD

Nの濃度) 3 μ Mとした。対照として、実施例1の方法で調製したFITC標識ODNを含まないHVJ-リボソームを注入した。全てのラットは2時間後に屠殺し、常法に基づき摘出した組織を4%パラホルムアルデヒド溶液に浸して固定した後、切片をエリクロームブラックTで処理し蛍光顕微鏡で観察した。200 μ l以上のHVJ-リボソームまたはBSS溶液(137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM トリス-塩酸)のみを注入した場合、ラットの死亡率が増加したため以下の実験では 100 μ lのHVJ-リボソームを用いた。

その結果、導入2時間後に肝細胞の少なくとも50~60%に蛍光が観察された。蛍光は肝臓以外の組織、すなわち腎臓、心臓、肺、脳には観察されなかった。FITC標識ODNを含まないHVJ-リボソームを注入されたラットまたは未注入のラットには蛍光は観察されなかった。

[実施例3] 新生児ラットへのヒトインスリン遺伝子の導入

ヒトインスリンベクターは以下のように構築した。ヒト胎児繊維芽細胞DNAを制限酵素EcoRIで部分的に切断しラムダ Charon 4Aへ挿入した。ヒトインスリン遺伝子の5'末端及び3'末端領域の³²P-標識プローブでハイブリッド形成することにより、ヒトインスリン遺伝子を含むファージブランクをスクリーニングした。ヒトインスリン遺伝子を含むラムダ Charon 4Aを単離し、Bam HIリンカーでBgl II/Bgl Iフラグメント(1.7 kb)とライゲーションした後、プラスミドpUC118へサブクローン化した。ニワトリ β アクチン遺伝子の5'プロモーター領域及び第一イントロン領域を含むプラスミドDNApAct-c-mybのNco I/Bam HI部位へ、ヒトインスリン遺伝子のNco I-Bam HIフラグメント(1.6 kb)を挿入した(図1)。なお、ニワトリ β -アクチンプロモーターは、「Kanei-Ishii C, Ishii S., Nucleic Acids Research 1989;17;1521-1536」に記載のものを用い、ヒトインスリンゲノミックDNAは、「Bell GI et al., Nature, 1980;284;26-32」に記載のものを用いた。ヒトインスリン遺伝子を含まないpActを対照ベクターとして用いた。

ヒトインスリンベクターまたは対照ベクターを含むHVJ-リボソームを調製した

。導入効率を上げるために、非ヒストン蛋白質であるハイモビリティグループ-1 (HMG-1)を同時にHVJ-リボソームに封入して用いた。実施例2の方法で作成した100 μ lのHVJ-リボソームを新生児ラットの肝臓へ腹腔壁を通して注入し、その後の肝臓におけるヒトインスリンmRNA発現を調べた。ラットは注入2週間後、4週間後、6週間後、8週間後に屠殺し肝臓からmRNAを以下のように抽出した。前述の時点で直ちに肝臓を摘出し、液体窒素で凍結させ、RNA抽出まで-80°Cにて保存した。グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法により、全肝臓より全RNAを抽出した。ヒトインスリン遺伝子に相補的なODNプライマー (5' プライマー : 5'-TCA-CAC-CTG-GTC-GAA-GCT-CTC-TAC-CTA-GTG-3' / 配列番号 : 1、3' プライマー : 5'-GTT-TT-T-GC-AGT-AGT-TCT-CCA-CCT-TCG-TAG-AGG-GA-3' / 配列番号 : 2) を用い、抽出したRNA 0.5 mgについて30サイクルのPCR増幅反応を行った。対照としてラット β -アクチンに対するプライマーを使用した。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動を行い、臭化エチジウムにより染色した。

その結果、ヒトインスリン遺伝子を含むHVJ-リボソームを注入2週間後、4週間後、6週間後、8週間後の時点でヒトインスリンmRNAの発現がRT-PCRにより確認された。ヒトインスリン遺伝子を含まない対照ベクターを用いた場合または未注入のラットにはヒトインスリンmRNAの発現は観察されなかった。一方、ヒトインスリンベクターまたは対照ベクターを注入したラットにおいては、ラット β -アクチンmRNAのバンドが観察された。結果を図2に示した。

ラジオイムノアッセイを以下のように行った。前述のようにラットをHVJ-リボソーム注入2週間後、4週間後、6週間後、8週間後に屠殺し、血液を採取した。¹²⁵I-インスリン二抗体RIAキット(塩野義製薬)を用いて血中のインスリンを測定した。

その結果、図3に示したようにHVJ-リボソームを注入したすべてのラットで、対照ベクターを導入した場合よりも有意に高い相当量の血中インスリンが確認された($P < 0.01$)。

[実施例4] 血漿インスリンレベルの経時変化及び宿主ゲノムにおけるヒトインスリンベクターのPCR分析

実施例3とは別途、HVJ-リボソーム注入3週間後、5週間後、7週間後の時点でラジオイムノアッセイ用の血液を4匹のラット(2匹はヒトインスリンベクターを導入したラットであり、他の2匹は対照ベクターを導入したラット)から採取した。全4匹のラットはHVJ-リボソーム注入7週間後に屠殺し、直ちに組織を液体窒素で凍結し、分析まで -70°C で保存した。ラット肝細胞の核由来のゲノミックDNAをDNA抽出キット(QIAGEN社)により抽出した。抽出したゲノミックDNA $1\mu\text{g}$ を全容量 $10\mu\text{l}$ の緩衝液中、 37°C にて制限酵素Eco RIおよびHind IIIで切断した溶液 $5\mu\text{l}$ について30サイクルのPCR増幅反応を行い分析した。PCR増幅反応の条件は実施例3に記したRT-PCR法と同様にした。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動を行い、臭化エチジウムにより染色した。ラット β -アクチンに対するプライマーを使用した対照実験についても同様に行った。

ヒトインスリンベクター及び対照ベクターを導入したラット血漿インスリンレベルの経時変化を観察した結果、ラットの成長の間、ヒトインスリンの分泌レベルは変化が無い。従って、注入後ヒトインスリン遺伝子はラット肝臓の細胞の核内に存在していると考えられる。更に宿主ゲノムにおけるヒトインスリンベクターのPCR分析を行った。ヒトインスリンベクターを導入したラット肝臓の細胞のDNA中にはヒトインスリン遺伝子の存在が確認されたが、対照ベクターを導入したラットではバンドが観察されなかった。一方、ラット β -アクチンに対するプライマーを使用した対照実験においては、いずれのベクターを用いた場合においても、 β -アクチンのバンドが容易に検出された。

産業上の利用の可能性

本発明によって、授乳期新生動物の肝臓に、核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物と遺伝子導入用ベクターとを含む組成物を適用することによって、

遺伝子が肝細胞に安定的に導入されることが明らかになった。肝臓は多くの蛋白質の合成の場であり、遺伝子が肝細胞に安定的に導入されることにより安定的に分泌される蛋白質は血流を介して全身に循環するため、疾病に対する効率的な治療効果が期待される。また、肝臓は多くの代謝性疾患の発症の場でもあり、遺伝子が肝細胞に安定的に導入されかつ発現されることにより、様々な疾病に対する遺伝子治療法が確立することが期待される。更に、該手法は他の多くの疾病に適用可能となることが期待される。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TCACACCTGG TCGAAGCTCT CTACCTAGTG

30

配列番号 : 2

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

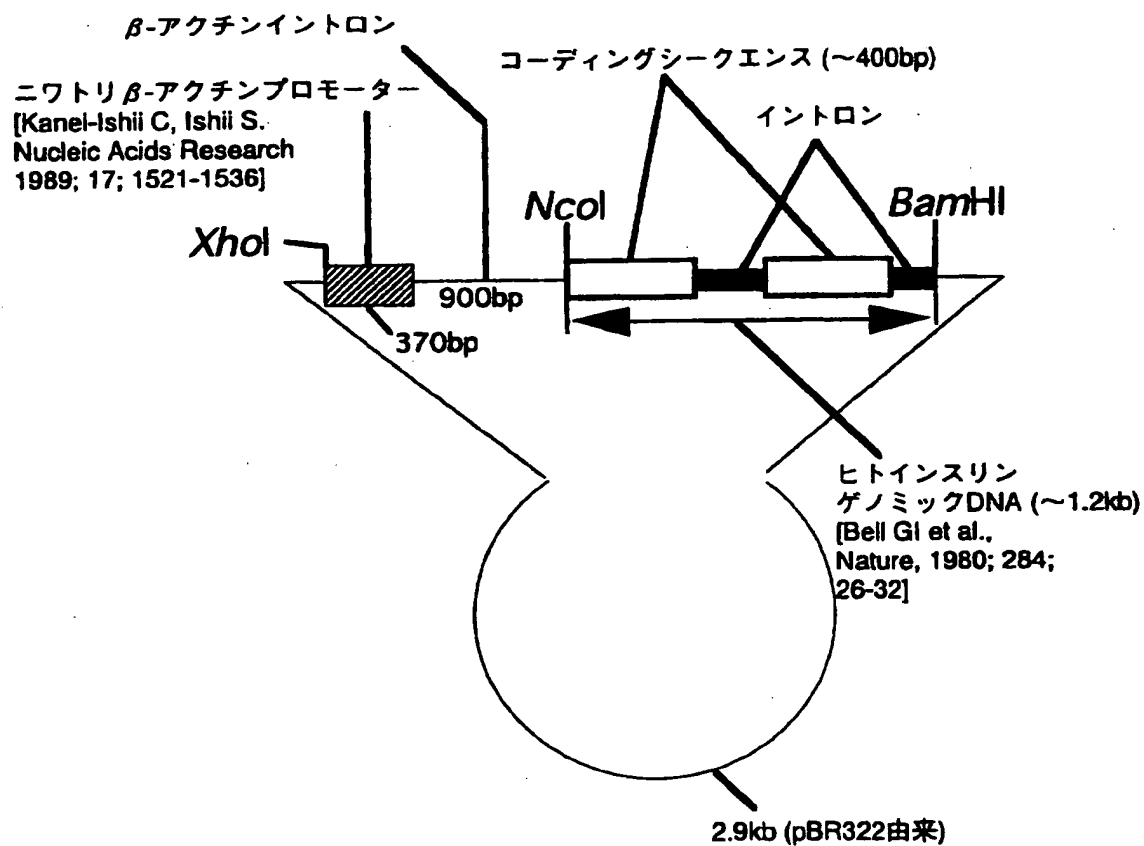
GTTTTTTGCA GTAGTTCTCC ACCTTCGTAG AGGGA

35

請求の範囲

1. 生体の肝細胞に遺伝子を安定的に導入するための、核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物と遺伝子導入用ベクターとを含む、授乳期新生動物の肝臓に適用される組成物。
2. 核酸及び肝細胞の両者に親和性を有する化合物がリボソームを形成している、請求項 1 記載の組成物。
3. 不活性化されたセンダイウィルスを含む、請求項 1 記載の組成物。
4. 核移行性蛋白質を含む、請求項 1 記載の組成物。
5. 請求項 1～4 のいずれかに記載の組成物またはその溶解物を、ヒト以外の生体の授乳期新生動物の肝臓に適用し、該生体の肝細胞に遺伝子を安定的に導入する方法。

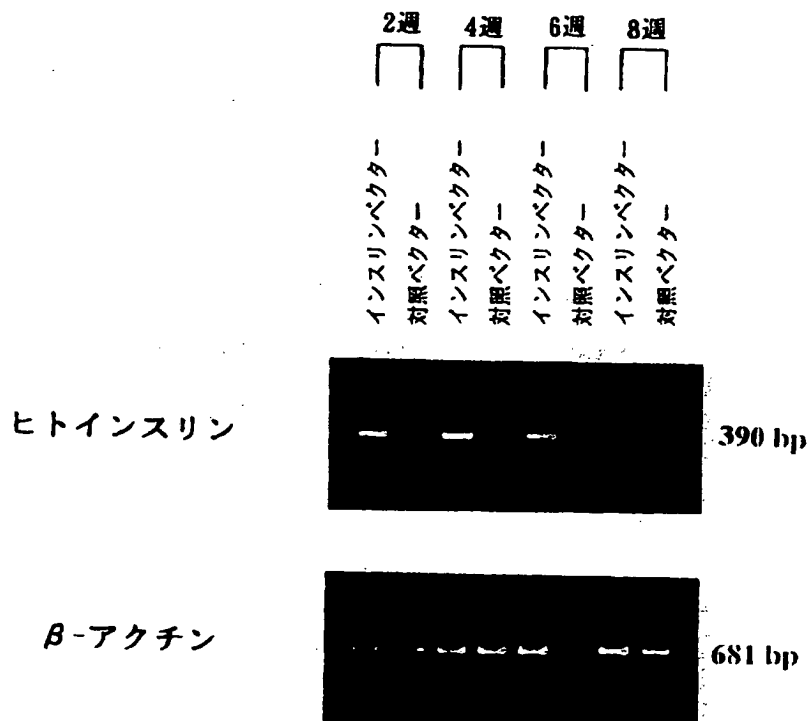
図 1



2 / 3

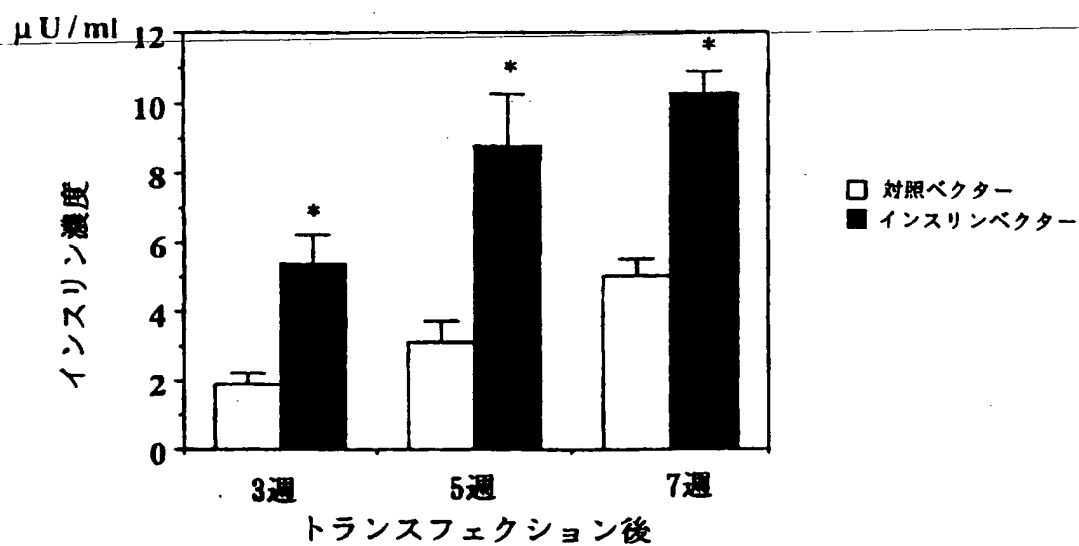
図 2

トランスフェクション後の肝臓における
ヒトインスリン mRNA 発現



3 / 3

図 3



* $p < 0.01$, 1集団について $N=6$ である。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ A61K48/00, C12N15/88, C12N15/67, C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ A61K48/00, C12N15/88, C12N15/67, C12N15/86~~Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched~~

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEW, CAS ONLINE, GENETYX-CD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Science, Vol. 243, 1989, Kaneda Y. et al.,; "Increased Expression of DNA Cointroduced with Nuclear Protein in Adult Rat Liver.", see P. 375-378	1 - 5
Y	J. Biol. Chem., Vol. 266, No. 6, 1991, Kato K. et al.,; "Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen in Adult Rat Liver.", see P. 3361-3364	1 - 5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 26, 1997 (26. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

June 3, 1997 (03. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁸ A 61 K 48 / 00, C 12 N 15 / 88, C 12 N 15 / 67, C 12 N 15 / 86

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁸ A 61 K 48 / 00, C 12 N 15 / 88, C 12 N 15 / 67, C 12 N 15 / 86

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEW, CAS ONLINE, GENETYX-CD

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Science, Vol. 243, 1989, Kaneda Y. et. al.; "Increased Expression of DNA Cointroduced with Nuclear Protein in Adult Rat Liver.", see P. 375-378	1-5
Y	J. Biol. Chem., Vol. 266, No. 6, 1991, Kato K. et. al.; "Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen in Adult Rat Liver.", see P. 3361-3364	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.05.97

国際調査報告の発送日

03.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

青藤真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448